اهمیت و روش انجام تست ***Panel Reactivity Ab*** در بیماران پیوند کلیه

زینب کربلایی پازکی[1]- سید ابوذر جزایری[2]

۱- کارشناس ارشد انگل‌شناسی، بیمارستان سینا/ دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی تهران
۲- کارشناس آزمایشگاه، بیمارستان سینا/ دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی تهران

کلیه‌ها از اعضای حیاتی بدن به شمار می‌روند. این دو ارگان لوبیا شکل که در دو سمت ستون مهره‌ها قرار دارند، فعالیت‌هایی نظیر تصفیه خون، دفع مواد زائد و آب اضافی و تنظیم الکترولیت‌ها و املاح بدن را برعهده دارند. اگر این عضو بدن دچار نارسایی شود و به‌تدریج از کار بیافتد، در حقیقت حیات فرد بیمار با خطر جدی مواجه می‌شود. برای بیماران با نارسایی مزمن کلیه، پیوند کلیه علاوه بر قطع همودیالیز می‌تواند زندگی آن‌ها را به سطح مطلوبی ارتقا دهد (۷-۱). پیوند کلیه (***Renal Transplantion***) عبارت است از کارگذاری کلیه انسان از شخصی به شخص دیگر. این پیوند می‌تواند از دهنده زنده (***Living Donor***) خویشاوند یا غیر خویشاوند و یا از جسد انسان (Non Heart Beating) و یا مرگ مغزی (***Brain Death***) صورت بگیرد (۸).

طی نیم قرن گذشته، دانش بشر در ارتباط با انجام یک پیوند کلیه موفق به‌طور چشم‌گیری افزایش یافته است و این امر مرهون مشخص شدن نقش مهم سیستم ایمنی در پذیرش و یا سرکوب یک پیوند می‌باشد.

علت اصلی رد پیوند، عدم تطابق ژنتیکی بین دهنده و گیرنده پیوند است که این عدم تطابق منجر به یک پاسخ ایمنی در بدن فرد گیرنده می‌گردد و درصورتی‌که این پاسخ مهار یا کنترل نشود می‌تواند به پیوند آسیب برساند. در اکثر طبقه‌بندی‌ها انواع رد پیوند و علل آن به شرح ذیل می‌باشد (۱۱-۱۰-۹):

۱- ***Hyper Acute Rejection***: چند دقیقه تا چند ساعت پس از پیوند

۲- ***Accelerated Rejection***: (با شتاب) چند روز پس از پیوند

۳- ***Acute Rejection***: (حاد) چند روز تا چند هفته پس از پیوند

۴- ***Chronic Rejection***: (مزمن) چند ماه تا چند سال پس از پیوند

در تمام انواع رد پیوند بجز رد پیوند ***Hyper Acute*** – که فقط سیستم ایمنی هومورال سبب رد پیوند می‌شود – هر دو پاسخ ایمنی هومورال و سلولار در پروسه رد پیوند دخیل هستند (۹).

آنتی‌ژن‌هایی که در رد پیوند کلیه بسیار حائز اهمیت هستند شامل آنتی‌ژن‌های گروه خونی ***ABO*** و آنتی‌ژن‌های لکوسیت انسانی (***HLA***) می‌باشند. یکی از مهم‌ترین عواملی که از بروز رد پیوند جلوگیری می‌کند، بررسی فرد گیرنده و دهنده از نظر آنتی‌ژن‌های فوق الذکر است.

همان‌طور که می‌دانید حضور ایمونوگلوبولین پنتامر (***IgM***) طبیعی و اختصاصی موجود علیه آنتی‌بادی‌های گروه‌های خونی باعث رد پیوند فوق حاد خصوصاً در پیوند قلب و کلیه می‌شود، زیرا در صورت ناسازگاری گروه خونی ***ABO*** قلب و کلیه پیوندشده بقا نخواهند یافت. اگرچه تطابق آنتی‌ژن‌های گروه خونی ***ABO*** برای جلوگیری از رد پیوند فوق حاد بسیار حائز اهمیت است، نمی‌توان نقش مهم آنتی‌ژن‌های لکوسیت انسانی (***HLA***) را در یک پیوند موفق نادیده گرفت. در پیوند کلیه هر چه تعداد آلل‌های ***HLA*** مشابه بین دهنده و گیرنده بیشتر باشد، بقای عضو پیوندی بیشتر است، تا جایی که اگر این تشابه آللی بین گیرنده و دهنده درصد بالایی داشته باشد می‌تواند اثر مطلوب‌تری نسبت به استفاده از داروهای سرکوب‌گر ایمنی در بقای پیوند داشته باشد (۱۲).

بیماران در انتظار پیوند آلوگرافت باید از نظر وجود آنتی‌بادی‌های از پیش ساخته‌شده برضد مولکول‌های ***HLA*** دهنده با دیگر آنتی‌ژن‌های سطحی سلول آزمایش شوند. دو نوع آزمایش برای ردیابی این نوع آنتی‌بادی‌ها انجام می‌شود؛ در آزمایش آنتی‌بادی واکنش‌دهنده پانل (***Panel Reactivity Ab***)، بیماران در انتظار پیوند عضو از نظر حضور آنتی‌بادی‌های از پیش ساخته‌شده واکنش‌دهنده با مولکول‌های ***HLA*** آلوژن شایع در جمعیت مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. این نوع آنتی‌بادی‌ها که ممکن است تولید آن‌ها پیامد حاملگی‌های قبلی، انتقال خون یا عمل پیوند عضو باشد، می‌توانند خطر رد فوق حاد یا رد حاد رگی را تعیین نمایند. این آزمایش هم‌اکنون در کشور ما به دو صورت سرولوژی و فلوسایتومتری انجام می‌شود (۱۲).

آزمایش ***Panel Reactivity Ab*** با روش سرولوژی به دو صورت ***WBC Cross match with Doner*** و ***WBC cross match with panel*** قابل انجام است (۱۳). مراحل انجام کار در هر دو روش کاملاً مشابه است، بجز تفاوت جزئی که در آخر به آن می‌پردازیم.

خونی که در این روش استفاده می‌شود خون تام و بدون ضدانعقاد است که البته دفیبرینه شده است. ازآنجاکه در این روش از کمپلمان جهت لیز سلولی استفاده می‌شود، خون نمی‌تواند حاوی ضدانعقادهایی نظیر ***EDTA*** و سیترات سدیم باشد چراکه این دو ضدانعقاد ضمن فعالیت خود یون ***CA ++*** را که برای شروع فعالیت کمپلمان الزامی است به مصرف می‌رسانند. استفاده از ضدانعقاد هپارین درصورتی‌که نمونه خون از آزمایشگاه دیگری ارسال می‌شود بلامانع است، اما باید دانست که هنگام جداسازی لنفوسیت‌های نمونه خون، حضور پلاکت‌ها در خونی که با هپارین همراه است باعث اختلال می‌شود که باید به کمک شستشو با بافر ***Hanks*** پلاکت‌ها حذف شوند.

جهت جداسازی لنفوسیت‌ها از محلول فایکول استفاده می‌کنیم. فایکول ترکیب کربوهیدراتی است که با نسبت مناسبی از پودر فایکول و سدیم دیاتروزوات در آب تهیه می‌شود. چگالی فایکول از آب مقطر بیشتر و حدود ۱/۰۷۷ است و این امر باعث می‌شود که به کمک این محلول اجزای مختلف خون از هم جدا شوند. این اجزا از بالا به پایین شامل سرم، هاله لنفوسیتی، محلول فایکول، لایه بسیار نازک بافی‌کوت و گلبول‌های قرمز می‌باشد. پس از اینکه هاله لنفوسیتی جدا شد، این لنفوسیت‌ها به محلول شستشوی ***Hanks*** اضافه می‌شوند.

Hanks محلول قندی- نمکی شستشوی لنفوسیت است. این محلول یک مایع استریل است که حاوی ترکیبات مختلفی مانند بی‌کربنات سدیم، کلرید سدیم، کلرید پتاسیم، فسفات پتاسیم مونوبازیک، فسفات سدیم دی‌بازیک و گلوکز می‌باشد. از این محلول جهت تهیه سوسپانسیون لنفوسیتی استفاده می‌شود. در ادامه پس از بررسی تعداد لنفوسیت‌ها به کمک لام نئوبار، لنفوسیت‌های افراد سالم در پلیت‌های مخصوصی تحت عنوان پلیت تراساکی و فضای پوشیده از ***Cover oil*** به‌صورت قطره‌ای شناور با سرم گیرنده پیوند مجاور می‌شوند. همزمان از دو سرم کنترل مثبت ALG (***Anti Lymphocyte Globulin***) و کنترل منفی AB نیز استفاده می‌شود. پس از طی شدن زمان انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، کمپلمان اضافه می‌شود. درصورتی‌که در بدن گیرنده پیوند ***Ab*** پیش‌ساخته علیه ***HLA*** موجود در سطح لنفوسیت‌ها حضور داشته باشد و کمپلکس ***Ag-Ab*** بوجود آمده باشد، کمپلمان وارد عمل شده و سلول را لیز می‌کند. جهت بررسی هرچه بهتر این پدیده پس از گذشت زمان انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت از رنگ ائوزین و نگهدارنده فرمالین استفاده می‌شود. درنهایت پس از گذشت ۱۵ دقیقه می‌توان به کمک میکروسکوپ معکوس (***Invert***) میزان لیز سلولی را به‌صورت درصد گزارش کرد.

نحوه گزارش نتیجه آزمایش:

ازآنجاکه گزارش درصد لیز سلولی در این روش به‌صورت کیفی است، حضور سرم کنترل مثبت و منفی در نحوه صحیح گزارش کمک‌کننده است.

سلول‌های لیزشده در مقایسه با سلول‌های سالم اندازه‌ای بزرگ‌تر و انکسار نور کمتری دارند. هم‌چنین نمونه‌های لیز شده به دلیل خروج محتویات سلول، زمینه‌ای کدر دارند.

گزارش نهایی به‌صورت درصدی از سلول‌های لیز شده در هر چاهک گزارش می‌شود. میزان لیز سلولی تا ۲۰٪ قابل‌قبول است اما درصورتی‌که این درصد افزایش داشته باشد نمونه بیمار باید مجدداً با تعداد سلول بیشتری تحت آزمایش قرار بگیرد.

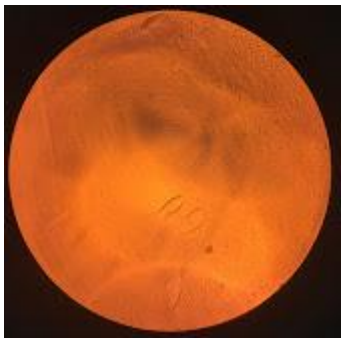
لازم به ذکر است در روش ***WBC Cross match with Doner*** سرم گیرنده به‌طور اختصاصی با لنفوسیت‌های دهنده پیوند، مجاور می‌شود.

در روش فلوسایتومتری، مقادیر اندکی از سرم بیماران با دانه‌های نشان‌دارشده با ماده فلورسنت و پوشیده از مولکول‌های ***HLA*** مشخص، مخلوط می‌شوند. مولکول‌های ***HLA*** مزبور نماینده آلل‌های ***HLA*** که ممکن است در عضو پیوندی وجود داشته باشند، خواهند بود. هر آلل ***HLA*** به یک دانه با ماده فلوئورسنت متفاوت متصل است. اتصال آنتی‌بادی‌های بیمار به دانه‌ها با فلوسایتومتری تعیین می‌شود (۱۴). نتایج به‌صورت درصد آنتی‌بادی واکنش‌دهنده (***PRA***)، که مقدار درصد آلل ***HLA*** که سرم بیمار با آن واکنش داده است، گزارش می‌گردد.

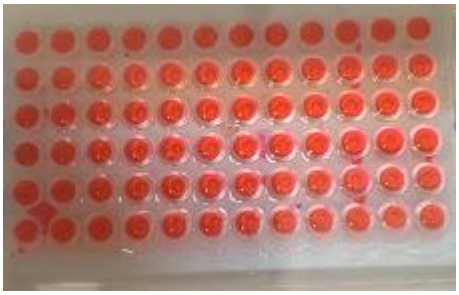
آنچه مسلم است روش فلوسایتومتری به دلیل وجود سیستم خودکار و عاری از نیروی انسانی در مقایسه با روش ***Panel Reactivity Ab*** از دقت بیشتری برخوردار است.

گزارش نتایج به‌صورت کیفی، هم‌چنین یافتن سلول لنفوسیت مراجعه‌کننده نرمال و زمان نسبتاً طولانی انجام تست به‌واسطه زمان‌های انکوباسیون طولانی از معایب روش ***Panel Reactivity Ab*** بشمار می‌رود؛ با این همه در دسترس بودن این تست نسبت به روش فلوسایتومتری و هزینه کمی که برای بیماران ایجاد می‌کند باعث شده همچنان در مراکز آزمایشگاهی پیوند کلیه مورد استقبال قرار بگیرد.

کنترل منفی



کنترل مثبت



پلیت تراساکی

رفرنس:

1- Harry J.M. Lemmens, MD, PhD. Kidney transplantation: recent developments and recommendations for anesthetic management. Department of Anesthesia, Stanford University School of Medicine, 300 Pasteur Drive, H3576 Stanford, CA 94305-5640, USA. Anesthesiology Clin N Am 22 (2004) 651– 662

2- Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipient of a first cadaveric transplant. N Engl J Med 1999;341(23):1725– 30.

3- Rabbat CG, Thorpe KE, Russell JD, Churchill DN. Comparison of mortality risk for dialysis patients and cadaveric first renal transplant recipients in Ontario, Canada. J Am Soc Nephrol 2000;11(5):917 – 22.

4- Ojo AO, Hanson JA, Meier-Kriesche H, Okechukwu CN, Wolfe RA, Leichtman AB, et al. Survival in recipients of marginal cadaveric donor kidneys compared with other recipients and wait-listed transplant candidates. J Am Soc Nephrol 2001;12(3):589– 97.

5- Meier-Kriesche HU, Port FK, Ojo AO, Rudich SM, Hanson JA, Cibrik DM, et al. Effect of waiting time on renal transplant outcome. Kidney Int 2000;58(3):1311– 7.

6- Brunkhorst R, Lufft V, Dannenberg B, Kliem V, Tusch G, Pichlmayr R. Improved survival in patients with type 1 diabetes mellitus after renal transplantation compared with hemodialysis: a case-control study. Transplantation 2003;76(1):115– 9.

7- Ferreira SR, Moises VA, Tavares A, Pacheco-Silva A. Cardiovascular effects of successful renal transplantation: a 1-year sequential study of left ventricular morphology and function, and 24-hour blood pressure profile. Transplantation 2002;74(11):1580–7

8- واحد فراهم‌آوری اعضاء بیمارستان سینا

9- Brian J. Nankivell, M.D., Ph.D., and Stephen I. Alexander, M.B., B.S., M.P.H. Rejection of the Kidney Allograft. N Engl J Med 2010;363:1451-62. Copyright © 2010 Massachusetts Medical Society

10- Sis B, Mengel M, Haas M, et al. Banff 09 Meeting Report: antibody mediated graft deterioration and implementation ofBanff working groups. Am Transplant2010;10:464-71

11- Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al.Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. Am J Transplant 2008;8:753-60.

12- ایمونولوژی سلولی و ملکولی ابوالعباس، ۲۰۱۵

13- Terasaka S[1], Kitada H, Okabe Y, Kawanami S, Noguchi H, Miyamoto K, Tsuchimoto A, Masutani K, Tanaka MLiving-donor kidney transplant in T-cell and B-cell flow cytometry crossmatch-positive patients. 2014 Jun;12(3):227-32.

14- Lentine KL, Graff RJ, Xiao H, Modanlou KA, Salvalaggio PR, Brennan DC, Pinsky BW, Burroughs TE, Schnitzler MA. Flow cytometry crossmatch before kidney transplantation in contemporary practice: target cell utilization, results patterns, and associated long-term graft survival. 2008:253-66